中華農業研究 (Jour. Agric. Res. China) 29(2): 147～155 (1980)

不同季節生長下母株菸草花葯培養植物體之形成[1]

蔡 新 聲[2]

摘要：利用 Hoagland 液體培養配合不同氮素濃度栽培菸草，以爲花葯培養植物體形成的材料，發現盛夏季節所栽培之菸草，其花葯培養植物體形成能力極差，若再配合過量或不足的氮素量則情形更嚴重；將夏日生長下的菸草花葯以石蠟切片法觀察其內部發育，發現此時期所形成的花葯，有許多是發育不正常的，其花粉囊均爲不正常細胞所佔滿，以至無法形成正常的小胞子，部份花葯雖有小胞子形成，但小胞子數少或許多均屬無功能者，這種情形可能是夏季生長的菸草花葯，培養後植物體形成低下的主要原因。此外，夏日配合過量氮素肥有刺激產生一花多葯的情形，反之缺氮則有形成一花少葯的趨勢。

花葯培養單倍體形成的技術，自 1964 年 Guha 及 Maheshwari [3,4,5] 氏首度在曼陀羅成功以來，其在作物育種改良上的潛力已無庸置疑，最近十多年來已廣受世界各國育種及遺傳學者所重視；爲了獲取足够的單倍體以爲育種材料之用，週年種植母體植物，以爲培養單倍體的材料實屬必要，許多學者在進行週年的花葯培養時，發現許多植物的花葯培養，其植物體的形成具有許多不同的變化；例如Engvild, Linde-Laursen 及 Lundqvist 等氏 [2] 即報導曼陀羅花葯培養植物體的形成，在各個試驗中均有些許差異，這種差異是因植物在不同的生長情形下所形成；蔡和林二氏 [13] 在從事一、二期作水稻的花葯培養時，得知一期作的結果比二期作好； Madrigal 及Murashige 二氏在從事菸草之週年花葯培養時，亦發現 3 ～ 4 月份所採取的菸草花葯，其植物體形成率最高，夏季 8 ～ 9 月份則最低（私人連繫）；筆者在從事菸草花葯培養植物體形成之研究時，亦發現盛夏季節所採取的花葯，其植物體形成率極差，爲了探求此低下之原因，本研究將生長於 5 ～11月份配合不同氮素量情形下之菸草花葯培養，利用石蠟切片法觀察花葯的發育，以找出盛夏季節裡，花葯培養植物體形成低下的原因。

材料與方法

一、菸草母體植物之栽培

將菸草 Wisconsin 38 號品種之種子播種於 1 ： 1 的 sponge rock 和 Canadian sphagnum 上，再覆以薄薄的一層細砂；當小苗達到葉片展開約 5 cm 寬時，假植到含有加州大學混合 2 號土（UC mix No. 2)的 2 吋塑膠盆上，待株高約10 cm，含有第11片葉時，小心洗淨根部泥土後移植於含有改良 Hoagland (1938) [9] 水耕液的培養基（表 1 ），爲了避免蒸發過度，3 加侖裝之塑膠栽培盆上覆蓋以三合蔗板，並用以固定菸草植物體，培養液中24小時通氣，全部植物體都生長在噴有白漆以避免溫度過高的溫室內，溫室內之光强在正午時約 30,000 lux。三種不同氮素量之 Hoagland 改良

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告 第 930 號。本試驗承美國加州大學 Riverside 分校 Dr. Toshio Murashige 提供試驗所需設備及指導，文成後復承謝主任順景及臺大陳其昌教授斧正，謹此致謝。

2. 本所農藝系技正。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

水耕液如表2，培養液之 pH 每隔7天調整爲 5.0±0.1 ，培養液初配時爲 12 升，當因蒸散作用而使水耕液降至 10 升以下時，加蒸餾水使重新達 12 升，培養液每 3 ～ 4 星期更換一次。

二、培養基之配製及花葯培養

採取花萼及花冠之比約等於 1 ： 1 的菸草花蕾，以 5 % Purex (含 0.5% NaClO) 消毒 10 分鐘後，再以無菌水清洗數次，然後將花葯自花蕾中取出接種於培養基上。基本培養基採用含有蔗糖 3 %，phytagar 0.8%, thiamine • HCl 0.4 mg/l, inositol 100mg/l 之 Murashige 及 Skoog [10] 基本培養基。pH 在消毒前經調整爲5.7±0.1，以 15 lb/in^2 121°C 高溫高壓消毒 15 分鐘。花葯的採取需特別小心，以避免花葯壁等體細胞組織受到傷害；每個花蕾含 5 個花葯，取其中一個立刻以醋洋紅壓漬法檢定其時期 (Tsay, 1980) [14] ，另取一個固定於 FAA 固定液中以爲組織切片之材料，若檢定發現小胞子發育時期正値第一次有絲分裂期，則將剩餘三個花葯培養於含有 25 ml 裝於 25× 150mm試管之 MS 培養基上，並於 27°±1°C 的恆溫，以 1000 lux 光强每日行 16 小時的照光下培養；資料的獲得是在花葯培養 7 星期後，取出於立體顯微鏡下計算求得，預備試驗顯示培養 7 星期時之花葯單倍體數達到最高。

表 1. Hoagland (1938) 基本培養液的組成份

Table 1. Composition of the Hoagland nutrient medium (1938)

Major elements				Minor elements			
Salts	mM	MW	mg/l	Salts	μM	MW	mg/l
Ca $(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	5	236.1	1181	H_3BO_3	46.0	61.8	2.86
KNO_3	5	101.1	506	$MnCl_2 \cdot 4H_2O^a$	9.1	198.0	1.81
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	2	246.4	493	$CuSO_4 \cdot 5H_2O$	0.3	249.0	0.079
KH_2PO_4	1	104.1	104	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.9	287.0	0.222
Iron tartrate^a	0.5% solution			MoO_3 (85%)^a	0.1	144.0	0.018

a. The original Fe, Mn and Mo sources present in Hoagland solution are modified as following table

Elements	Salts	μM	MW	mg/l
Fe	Na$_2$-EDTA	200	336.2	37.3
	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	100	277.9	27.8
Mn	$MnSO_4 \cdot H_2O$	9.1	169.0	1.54
Mo	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.1	242.2	0.025

三、組織切片法

將小胞子不同發育時期的花葯固定於 FAA 固定液中至少 24小時 ，經一系列不同濃度的 TBA 脫水後封埋於 Paraplast 中 (一種石蠟) ，以鋼刀切片機切取 10μ 厚度 ，以 Heidenhain's iron hematoxylin 染色，再以光學顯微鏡觀察。

結果與討論

圖 1 顯示在夏季 8 ～ 9 月份所做的花葯培養，每個花葯的植物體數均較其它月份所得爲低，雖然圖 2 顯示 8 月份之花葯培養，其產生植物體的花葯仍可高達 60 %，但這種時期的花葯，大多數每個

表 2. Hoagland 爲基礎之各種氮素濃度

Table 2. Nitrogen levels and modifications of Hoagland's solution for culture of tobacco plants.

mM Nitrogen in Culture Solution	Salts	mM	mg/l
	KNO_3	4.5	454.5
4.5	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	5.0	735
	KCl	0.5	37.5
15.0	$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	5.0	1180
	KNO_3	5.0	505
	$Ca(NC_3)_2 \cdot 4H_2O$	5.0	1180
45.0	KNO_3	5.0	505
	NH_4NO_3	15.0	1200

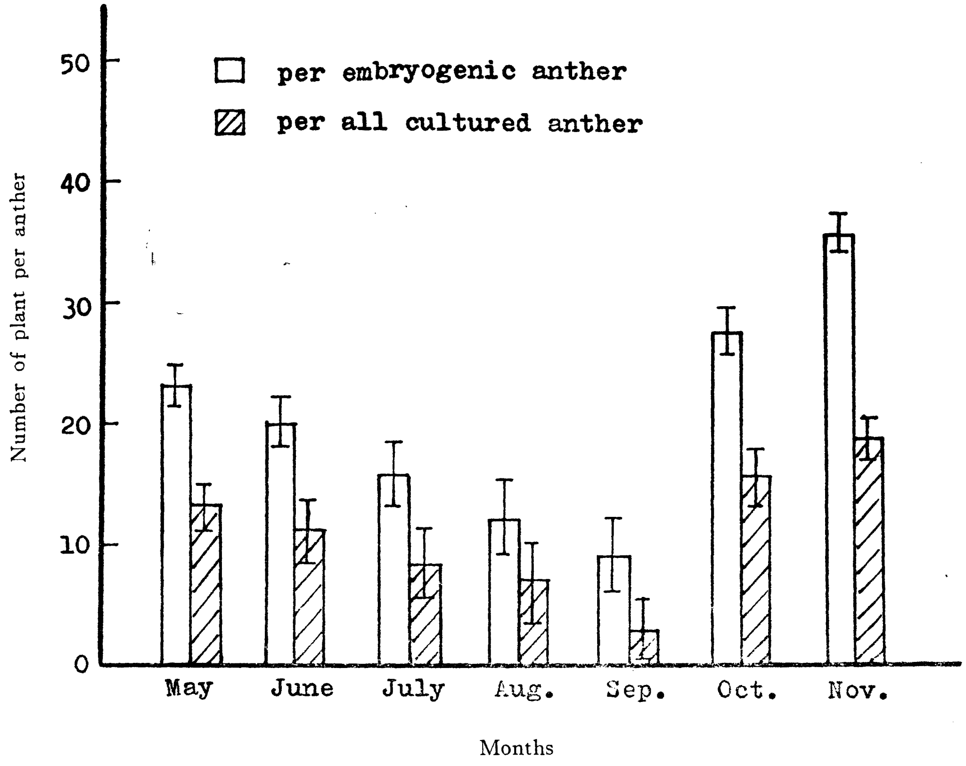

圖 1. 生長於 Hoagland 基本培養液下之母體植物，不同月份之花葯培養所得平均植物體數。

Fig. 1. The number of plants per cultured anther taken from donor plants at different month (donor plants grown in basic Hoagland solution).

花葯只產生 1～2 株植物體。從 5 到11月的七個月中，以11月較低溫度時（日夜平均溫度約 18°20～°C）花葯培養所得之植物體最多。相同的地點（加州大學 Riverside 分校）Madrigal 及 Murashige 二氏從事菸草花葯的週年培養，亦認爲夏季月份所得之花葯，植物體形成率最差（私人

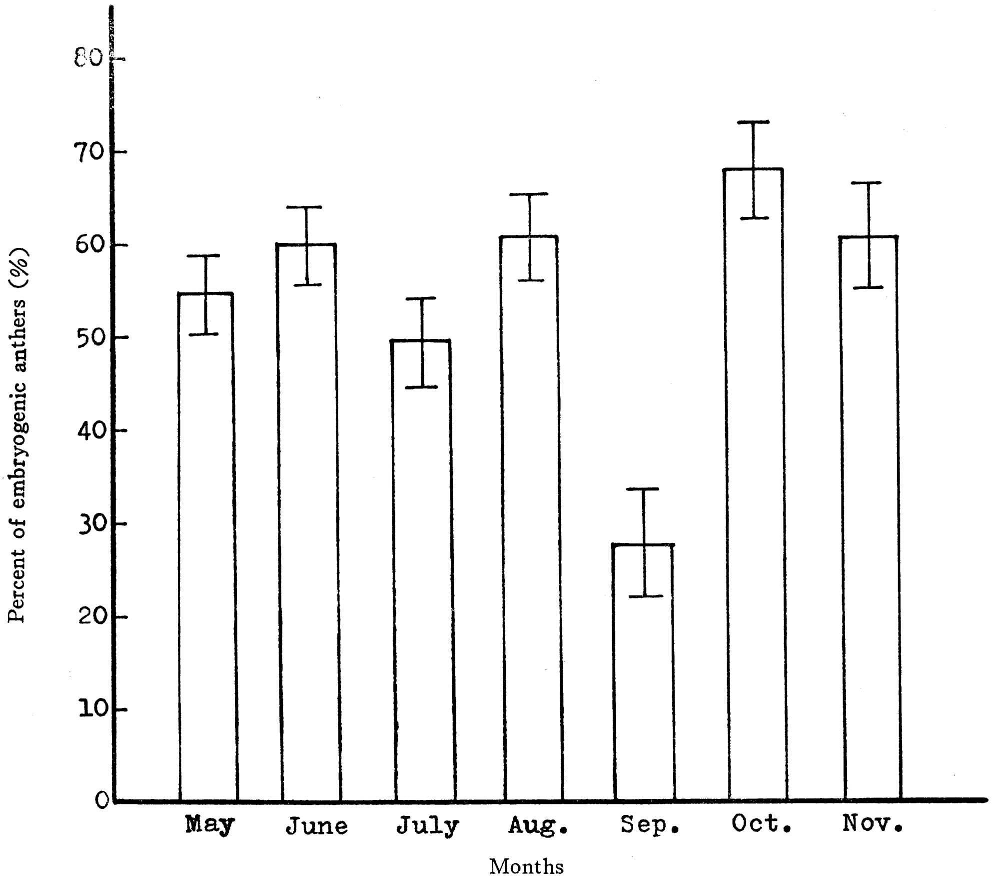

圖 2. 生長於 Hoagland 基本培養液下之母體植物，不同月份花葯培養產生植物體之平均花葯數。

Fig. 2. The percentage of embryogenic anthers of cultured anther taken from donor plants at different month (donor plants grown in basic Hoagland solution).

連繫）；氣象資料顯示此地區之溫室，因地處沙漠邊緣，夏季 8～9 月份中午時之溫度，雖有冷氣調節，但仍可高達 40°C 左右，尤其靠近溫室玻璃頂之地更高，所以推測高溫可能是造成此時期花葯培養植物體形成低下的主要原因。再者，夏季時的長日，此地區可達 16 小時左右，Dunwell [1] 曾報導母體植物生長於 16 小時日長下之菸草花葯培養，其 bud productivity（每個花蕾所生之植物體數）爲 8.1，而相同光強 8 小時短日處理之母株，其 bud productivity 却可高達 43.4 ，所以日長可能是此時期花葯培養反應不良的另一原因。

利用醋洋紅壓漬法對每個花蕾中之一個花葯進行觀察時，發現夏季月份所生之花葯，常有許多不含小胞子的不正常花葯產生，其比例如表 3 所示：

表 3. 7 -11 月份生長下之菸草母體植物所含不正常花葯數的百分比。

Table 3. The precentage of flower buds with abnormal anthers (no microspore) taken from donor plants at July to November.

Flowering Month	mM Nitrogen in Culture Solution	Number of Flower Buds Inspected	Abnormal Flower Buds		
			Number	%	95%Cl[a]
July	4.5	158	25	15.8	10-23
	15.0	203	6	3.0	1-6
	45.0	180	24	13.3	8-19
August	4.5	220	87	39.5	3347
	15.0	164	9	5.5	3-10
	45.0	144	44	30.6	23-40
September	4.5	240	67	27.9	22-3
	15.0	301	28	9.3	6-13
	45.0	270	61	22.6	18-28
October	4.5	232	2	1.0	0-4
	15.0	288	0	0.0	0-1
	45.0	264	1	0.4	0-2
November	4.5	196	0	0.0	0-2
	15.0	233	0	0.0	0-1
	45.0	2.07	0	0.0	0-2

a. 95% confidence limit

表 3 資料顯示夏季月份生長的菸草，氮素量過多或不足均可促進不含小胞子的不正常花葯大量產生，這種情形以 8 - 9 月份最嚴重，7 月份次之，10月份已極少，11 月份則不管氮素多寡，所生之花葯均含有小胞子，5 、6 月份資料不全故未列上。

高溫配合氮素量供給的不平衡，亦可使每個花蕾內所含有的花葯數產生極大的變化，如表 4 所示：

表 4. 9 月份生長的母體植物，每個花蕾內花葯數之變異情形

Table 4. The variation of anther number in flower buds taken from donor plants flowered in September.

mM Nitrogen in Culture Solution	Number of Flower Buds Inspected	No of Flower buds Contained 3 Anthers			No. of Flower Buds Contained 4 Anthers			No. of Flower Buds Contained 5 Anthers			No. of Flower Buds Contained 6 Anthers		
		No.	%	95%Cl[a]	No.	%	95%Cl[a]	No.	%	95%Cl[a]	No.	%	95%Cl[a]
4.5	241	1	0.4	0-2	70	29.1	23-35	170	70.5	65-77			
15.0	301				43	14.3	10-19	258	85.7	81-90			
45.0	270				47	17.4	12-22	210	77.8	72-83	13	4.8	3-8

a. 95% Confidence limlt

表 4 的資料顯示夏季高溫，長日缺氮生長下的菸草花蕾，有形成較少花葯的趨勢，例如一般正常的花蕾含有 5 個花葯，而低氮素量生長下，則有 29.1 %只含 4 個花葯的花蕾，正常花蕾數只佔 70.5 %，更有 0.4%的花蕾只含 3 個花葯的。高溫長日多氮則反而有使每一花蕾產生多葯的趨勢；例如過量氮素(45 mM)下之花蕾，有 4.8 %含有 6 個花葯，這種多葯的花蕾在 4.5及 15 mM 氮素下全無發生，但過量氮素亦可產生只含 4 個花葯的不正常花蕾 (17.4%) 。醋洋紅壓潰法檢察得知每個花蕾的花葯數和不含小胞子的不正常花葯間並無相關關係；即含有 4 或 6 個花葯的花蕾，其花葯內的小胞子常是十分正常，而含有 5 個花葯的正常花蕾 ，其所生花葯的小胞子却常有不正常的情形發生。 10 月份所生過多或不足花葯的花蕾數很少，只佔 2 % 而已 ，可能的原因為溫度下降及日照時間的縮短，11月份則幾全為正常之花蕾。

將正常的花葯及不含有小胞子之不正常花葯，以石蠟切片法觀察其內部構造時，發現正常小胞子的分裂及不正常花葯小胞子囊異常的情形如圖 3 及圖 4 。

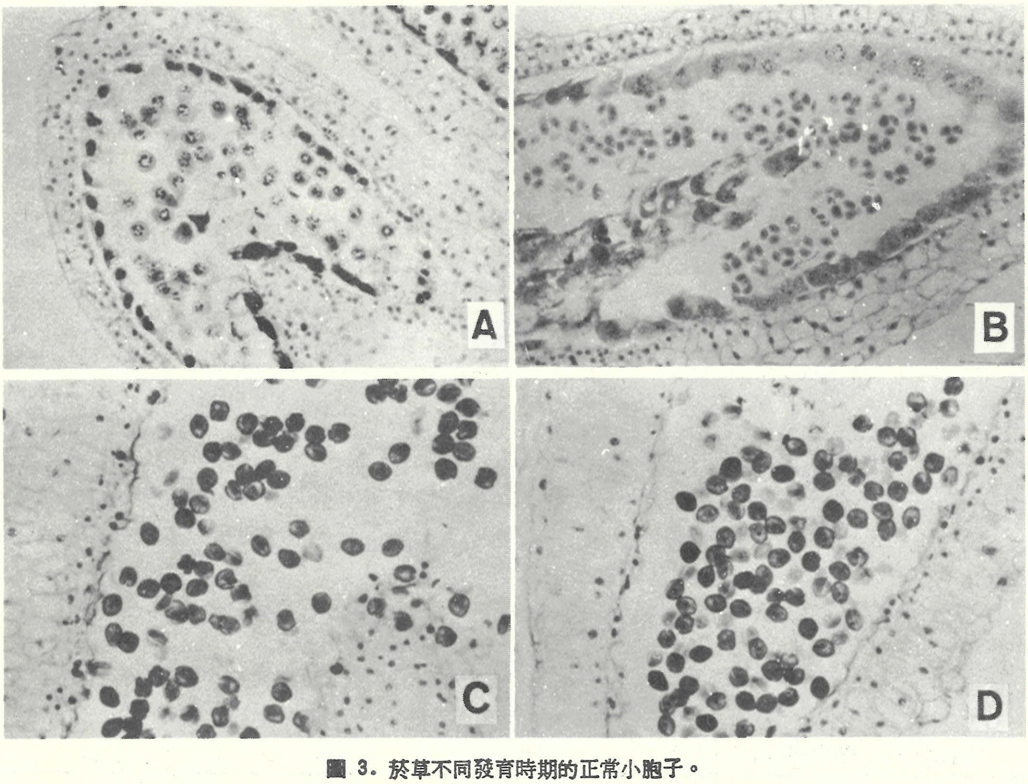

圖 3. 菸草不同發育時期的正常小胞子。

Fig. 3. The normal microspores of *N. tabacum* at different developmental stages. A. meiosis stage B. tetrad stage C. first pollen mitosis stage D. early binucleate stage. Magnification : 55OX

圖 3 顯示正常的小胞子發育，在減數分裂期花葯壁最內層之 tapetum 層發育良好，其細胞核極大(fig. 3-A) ，四分子期則 tapetum 層位於緊貼花葯壁的內層，呈單層整齊排列(fig. 3-B)，第一次有絲分裂期 tapetum 層開始分解，以供給小胞子發育的養份 (Maheshwari, 1950) [8] ，至雙核期則 tapetum 只剩薄薄一層不十分明顯的細胞(fig. 3-D)，小胞子在全發育期中可見核之分裂，小胞子形成後更可見單一之獨立個體 。而圖 4 所示之不正常花葯則幾乎未見小胞子之分裂，花粉囊內幾

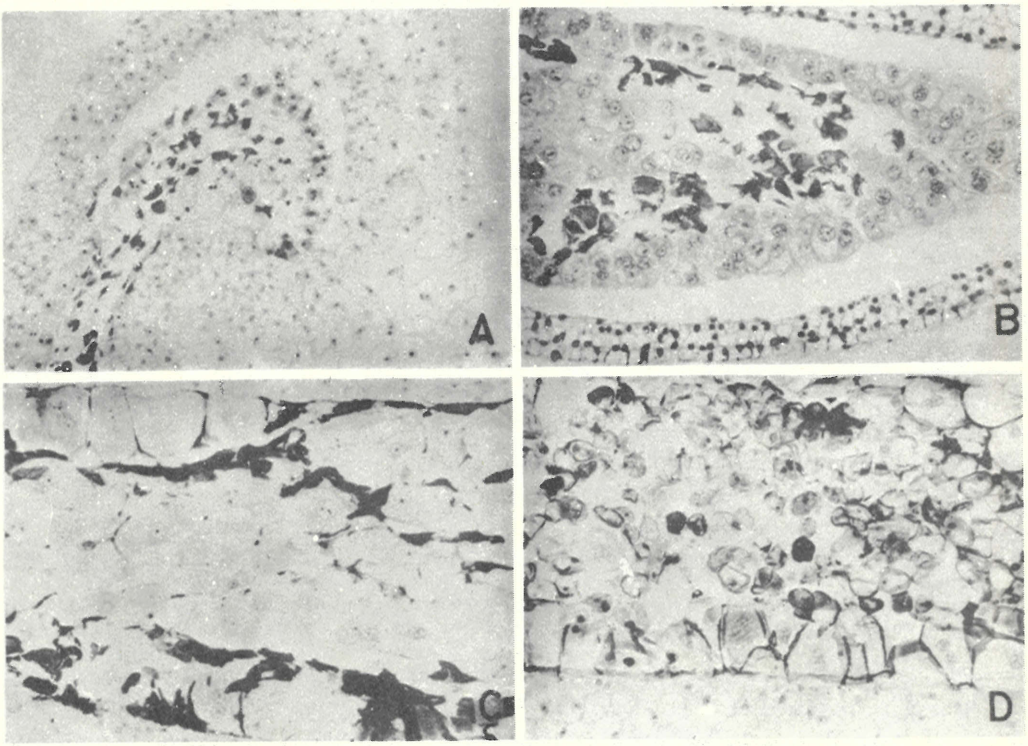

圖 4. 菸草不同發育時期的不正常小胞子。

Fig. 4. The abnormal microspores of *N. tabacum* at different developmental stages. A. meiosis stage B. tetrad stage C. first pollen mitosis stage D. another type of abnormal anther at first pollen mitosis stage. Magnification : 550X

乎全爲不正常分裂之 tapetum 細胞所佔滿，四分子期之花粉囊內 tapetum 層厚而遠離花葯壁(fig. 4-B)，擬似 tapetum 細胞的細胞間隙間充滿着染色成黑色之不明物質 (fig. 4-C)，有些花粉囊內的小胞子變化爲擬似石細胞狀之形體 (fig. 4-D)，十分明顯的，若取材自這些不正常的花葯培養，植物體的產生當屬不可能。

Sunderland [11] 氏曾指出，利用花萼、花冠長度的比例做爲小胞子不同發育時期的指標，常會因母體植物開花的早晚而產生極大的偏差；Sunderland, Collins 及 Dunwell [12] 等氏亦認爲即使相同植物的每個個體間，其開花生理也都會有不同程度的差異，所以利用花萼、花冠之比值做爲小胞子發育時期的指標，除了容易發生檢定時期不精確外，亦可能將含有不正常小胞子的花葯取之培養，因而造成單倍體形成的低下；本試驗雖對每個花蕾中的五個花葯取其中之一以醋洋紅壓潰法檢查其時期，但相信也會有每個花蕾中的五個花葯各有發育不同的現象。Muraoka 及 Ohori [9]，Kasperbauer [7] 等氏曾報導菸草。母體植物生長於 8 小時短日， 18°C 恆溫下，花的形成最快且發育得最完全；Dunwell [1] 也曾報導生長於 8 小時短日強光 (14,000 lux), 20°C 下之菸草，其花葯培養而導致 anther productivity (每個花葯所形成的植物體數)最高；他解釋由於溫度及日長效果交互的作用，花葯壁所生荷爾蒙處於最有利於胚發育的平衡狀態，是此種處理菸草花葯培養易於誘致植物體形成的主要原因，本試驗中，夏季月份所栽培之菸草，由於花蕾、花葯及小胞子之異常，而導致培養後植物體形成能力之低下，即可能與溫度及日照二個重要因子有關。

參 考 文 獻

1. Dunwell, J. M. 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth in cultured anther of *Nicotiana tabacum*. Environ. Exp. Bot. 16 : 109-118.
2. Engvild, K. C., I. Linde-Laurson and A. Lundqvist. 1972. Anther cultures of *Datura innoxia* : flower bud stage and embryoid level of ploidy. Hereditas 72 : 331-332.
3. Guha, S. and S. C. Maheshwari. 1964. In vitro production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204 : 497.
4. Guha, S. and S. C. Maheshwari. 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura* in vitro. Nature 5059 : 97-98.
5. Guha, S. and S. C. Maheshwari. 1967. Development of embryoids from pollen grains of *Datura* in vitro. Panchanan Maheshwari Memorial : 454-461.
6. Hoagland, D. R. and D. I. Arnon. 1938. The water culture method for growing plants material soil. UC Agri. Exp. Sta. Circular 347 : 1-39.
7. Kasperbauer, M. J. 1970. Photo-and thermo-control of flowering in tobacco(*Nicotiana tabacum* L.). Agron. J. 62 : 825-827.
8. Maheshwari, P. 1950. An introduction to the embryology of angiosperms. pp : 28-53. New York-Toronto London, McGraw-Hill.
9. Muraoka, Y. and K. Ohori. 1956. Developmental responses of tobacco plants under various temperatures and photoperiods. Proc. Crop. Sci. Soc. Japan 25 : 104-106.
10. Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue culture. Physiol. Plant. 15 : 473-487.
11. Sunderland, N. 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In : Kasha, K. J. (ed.)Haploids in higher plants : Advances and potential. pp : 91-122. Guelph, Uuiv. Guelph.
12. Sunderland, N., G. B. Collins and J. M. Dunwell. 1974. The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. Planta 117 : 227-241.
13. Tsai, S. C. and M. H. Lin. 1977. Production of rice plantlets by anther culture. J. Agri. Res. China 26 (2) : 100-112.
14. Tsay. H. S. 1980. Strong acid treatment for making smears of tobacco microspores. J. Agri. Res. China 29 (2) : 103-106

Tobacco plants formation from anther culture as influenced by the mother plants grown under different seasons[1]

Hsin-Sheng Tsay[2]

Summary

The anthers of *N. tabacum* cv. Wisconsin 38 which were grown in Hoagland nutrient solution with different nitrogen levels were collected during the period of May-November. The collected anthers were cultured in Murashige and Skoog medium (1962) to produce haploid plants.

It was found that the embryogenic ability of anthers collected from the plants grown under the high temperature and long photoperiod condition (August-September) was extremely lower than those collected from the plants grown under the lower temperature and shorter photoperiod condition. In the hot summer season, the abnormal cells instead of functional microspores in pollen sacs as it was observed by the cytological study. The effects of high temperature and long photoperiod on the abnormal formation of microspore were considered to be the main reason why the embryogenic ability is so poor when this kinds of anthers were cultured in vitro.

Further, it was observed that the rate of abnormal anther was promoted when tobacco plants were cultured under either excess or deficient nitrogen supply condition. The low nitrogen supply resulted in fewer anther formation per flower bud and more anther formation per flower bud under the high nitrogen supply condition as compared with controls.

1. Contribution No. 930 from Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Senior Agronomist, Department of Agronomy, TARI. Wufeng, Taichung Hsien, Taiwan 431. ROC.